

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
津田泰宏	主査 教授 花房 俊昭 副査 教授 佐野 浩一 副査 教授 清水 章 副査 教授 玉井 浩 副査 教授 北浦 泰
主論文題名 <b>Three Different Neutrophil Subsets Exhibited in Mice with Different Susceptibilities to Infection by Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i></b> (メチシリン抵抗性ブドウ球菌に対する感受性が異なるマウスに存在する三種類の好中球)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>全身性炎症反応症候群 (SIRS) の患者は種々の病原菌に対し強い感染感受性を示す。特にメチシリン抵抗性ブドウ球菌感染症 (MRSA) は、使える抗生物質が限られている事もあって、大きな臨床問題になっている。MRSA 感染症に対する宿主の初期抵抗性は innate immunity によってもたらされるが、その effector 細胞はマクロファージ (M<math>\phi</math>) と好中球である。マクロファージは非活性型マクロファージ (resident M<math>\phi</math>) の形で宿主に存在するが、感染などの刺激により、従来より知られている古典的活性化マクロファージ (CAM<math>\phi</math>) や免疫抑制型のマクロファージ (AAM<math>\phi</math>) に変化し、侵入異物に対処する。しかし、好中球に関しては種々の説があるものの、明確な subtype の存在は知られていない。今回、申請者は MRSA に対する感染抵抗性が異なる3種類のマウス (正常マウス、重度 SIRS マウス、軽度 SIRS マウス) よりそれぞれ異なる生物化学的作用を有する三種類の好中球を発見したので報告する。</p> <p>《材料及び方法》</p> <p>体表面積の 15% が3度の flame burn (重度 SIRS) 及び 1-2 度の scald burn (軽度 SIRS) で被われる2種類の火傷マウスを作成し実験に用いた。MRSA 感染症に対する宿主の初期抵抗性における好中球と M<math>\phi</math> の関係を明確にするため、好中球と M<math>\phi</math> しか免疫担当細胞を持たないマウス (SCIDbg マウス) 及び更にそれらのマウスから好中球 (SCIDbgN マウス) あるいは好中球と M<math>\phi</math> の両方を除いたマウス (SCIDbgMN マウス) を作成し、それらに好中球を移入して再構成した後、SCIDbg マウスに対して 1 LD<sub>50</sub> に相当する量の MRSA を静脈内より感染させた。好中球と M<math>\phi</math> はマウスの末梢血及び腹腔内滲出液よりそれぞれ分離した。正常マウス、重度 SIRS マウス及び軽度 SIRS マウス由来好中球の性状を比較するため、サイトカイン/ケモカイン産生能、Toll-like receptor 及び CD11b/CD49d 表面抗原について検定した。またこれらの好中球を resident M<math>\phi</math> と dual-chamber transwell を用いて培養した後、得られた M<math>\phi</math> の CCL5 産生/iNOS 発現 (CAM<math>\phi</math>) 及び CCL17 産生/mannose receptor 発現 (AAM<math>\phi</math>) について検定した。次にその作用機序を調べるため、上記好中球の培養上清を各々の培養上清より検出されたサイトカイン/ケモカインに対する単一抗体で処理した後、resident M<math>\phi</math> 培養系に加え、CAM<math>\phi</math>/AAM<math>\phi</math> への転換を解析した。更に SCIDbgN マウスに好中球の代わりに、遺伝子組み換え型サイトカイン/ケモカインを投与し、MRSA 感染に対する抵抗性を調べた。</p>	

## 《結果》

SCIDbg マウスに対して1LD<sub>50</sub>に相当する MRSA を感染させると、全ての重度 SIRS マウスが感染死し、全ての軽度 SIRS マウスは生存した。更に軽度 SIRS マウス由来の好中球 (PMN-I) は1LD<sub>50</sub>に相当する MRSA を感染させた SCIDbgN マウスを全て生存させ、transwell を用いた *in vitro* の実験にて resident Mφ を CAMφ に転換させた。一方、重度 SIRS マウス由来の好中球 (PMN-II) は同量の MRSA 感染 SCIDbgN マウスを全て感染死させ、transwell を用いた *in vitro* の実験にて resident Mφ を AAMφ に転換させた。正常マウス由来の好中球 (PMN-N) はこれらの作用を示さなかった。PMN-I は CCL3 と IL-12 産生能を有し、細胞表面に Toll-like receptor 2, 4, 5, 8 と CD49d を発現させているのに対し、PMN-II は CCL2, IL-10, IL-4 を産生し、その細胞表面に Toll-like receptor 2, 4, 7, 9 と CD11b を発現していた。PMN-N は明らかなサイトカイン/ケモカイン産生能を持たず、Toll-like receptor 2, 4, 9 を発現した。PMN-I の培養上清は *in vitro* にて resident Mφ を CAMφ に転換させたが、CCL3 と IL-12 に対する単一抗体の混合物にて処理した結果、CAMφ の出現は阻害された。一方、PMN-II の培養上清は同様に CCL2 と IL-10 に対する単一抗体の混合物の処理にて、resident Mφ を AAMφ に転換する能力を失った。更に遺伝子組み換え型 CCL3/IL-12 の混合物の投与は、PMN-I と同様に SCIDbgN マウスを MRSA 感染抵抗性にし、遺伝子組み換え型 CCL2/IL-10 の混合物は PMN-II と同様にそれらのマウスを MRSA 感染感受性にした。

## 《考案と結論》

今回、MRSA に対する感染抵抗性の異なるマウスから、三種類の異なる好中球 subset を得た。これらの好中球は Mφ の活性化を通して、宿主の MRSA に対する感染抵抗性を修飾することが判明した。これまで MRSA 感染症に対する宿主の免疫反応は Mφ に依存すると考えられていたが、今回の申請者の実験結果は好中球の極めて重要な役割を明らかにした。異なる好中球 subset の存在は以前より示唆されていたが、その生化学的意義は全く明らかにされていなかったため、今回の申請者の実験結果はその意味で全く新しい発見と考えても差し支えないものと思われる。

最近の申請者の実験結果によると、AAMφ 優位の宿主では CAMφ が誘導されなかった。術後や多発外傷・火傷後に SIRS と診断される患者は AAMφ 優位宿主なので、当然 CAMφ が誘導されない。もし AAMφ 優位宿主の根源に PMN-II の出現があるとするならば、これら患者に出現する PMN-II を制御することにより MRSA 感染を制御することが出来る可能性がある。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	津 田 泰 宏
論文審査担当者		主 査 教授 花 房 俊 昭 副 査 教授 佐 野 浩 一 副 査 教授 清 水 章 副 査 教授 玉 井 浩 副 査 教授 北 浦 泰	
主論文題名 Three Different Neutrophil Subsets Exhibited in Mice with Different Susceptibilities to Infection by Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (メチシリン抵抗性ブドウ球菌に対する感受性が異なるマウスに存在する三種類の好中球)			
論文審査結果の要旨			
<p>全身性炎症反応症候群(SIRS)の患者は innate immunity が損なわれているために種々の病原菌に対し強い感染感受性を示す。Innate immunity の effector 細胞はマクロファージ(M<math>\phi</math>)と好中球などである。マクロファージは非活性型マクロファージ(resident M<math>\phi</math>)から古典的活性化マクロファージ(CAM<math>\phi</math>)または免疫抑制型マクロファージ(AAM<math>\phi</math>)に変化して侵入異物に対処する。しかし、好中球に関しては種々の説があるものの、明確な subtype の存在は知られていない。今回申請者は MRSA に対する感染感受性が異なる3種類のマウス(軽度 SIRS マウス、重度 SIRS マウス及び正常マウス)の末梢血よりそれぞれ異なる生物化学的作用を有する三種類の好中球 subset (PMN-I、PMN-II 及び PMN-N)を分離し、これらの好中球が M<math>\phi</math>の活性化を通して、宿主の感染抵抗性を修飾する事を明らかにした。本論文で得られた知見を以下に記す。</p> <p>(1) 軽度 SIRS マウスは MRSA に対して感染抵抗性であったのに対し、重度 SIRS マウスは感染感受性であった。</p> <p>(2) 軽度 SIRS マウスには PMN-I あるいは CAM<math>\phi</math>が存在していたのに対し、重度 SIRS マウスは PMN-II あるいは AAM<math>\phi</math>のキャリアであった。</p> <p>(3) PMN-I によって誘導された CAM<math>\phi</math>が MRSA 感染に対する effector 細胞であった。一方 PMN-II によって誘導された AAM<math>\phi</math>は宿主の MRSA に対する感染感受性を亢進させていた。</p> <p>(4) PMN-I、PMN-II 及び PMN-N はサイトカイン/ケモカイン産生能、M<math>\phi</math>の活性化作用、Toll-like receptor 及び細胞表面マーカーにてそれぞれ区別可能であった。</p> <p>最近 AAM<math>\phi</math>優位の宿主には CAM<math>\phi</math>が誘導されないことが明らかとなっている。術後や多発外傷・火傷後に SIRS と診断される患者は AAM<math>\phi</math>優位宿主なので、それがこれらの患者が感染感受性になる原因と考えられている。本論文が示しているように、もし AAM<math>\phi</math>優位宿主の根源に PMN-II の出現があるとするならば、PMN-II を制御することによりこれらの患者に併発する感染症を防御あるいは治療出来る可能性がある。本論文の知見は innate immunity の研究に新しい視点を提供していると同時に SIRS 患者などの AAM<math>\phi</math>優位宿主の感染症に対する新しい治療法を確立するための重要な情報を提供している。</p>			

以上により、本論文は本学大学院学則第9条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Immunity 21: 215-226, 2004